

IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATERIAL BIOLÓGICO POR CCD

I - AMOSTRA

Urina (recente ou conservada sob refrigeração)

II - MATERIAL

1- Soluções-padrão de fármacos 0,1% em etanol

- | | |
|---------------------|-----------------------|
| a) Ácido Salicílico | h) Clorpromazina |
| b) Fenobarbital | i) Fenilpropanolamina |
| c) Tionembital | j) Nicotina |
| d) Fenitoína | k) Codeína |
| e) Cafeína | l) Estricnina |
| f) Diazepam | m) Cocaína |
| g) Haloperidol | |

2- Lâmpadas de ultra-violeta

3- Placas cromatográficas

4- Cubas de vidro

5- Capilares

6- Nebulizadores

7- Sistemas Solventes

- a) Clorofórmio : acetona (4:1)
b) Clorofórmio : metanol (9:1)

8- Agentes Cromogênicos

a) Solução de cloreto férrico a 5% (FeCl_3)

b) Reativo de Sulfato de Mercúrio (HgSO_4)

HgO 5% 100 mL

H_2SO_4 20 mL

Resfriar e completar com água destilada até 250 mL.

c) Solução etanólica de difenilcarbazona (DFC) a 0,1% de preparo recente. Conservar sob refrigeração.

d) Reagente de Dragendorff Iodado (DI)

A) KI 12,0 g

B) BiNO_3 0,50 g

H_2O dest. 40 mL

Ác. Acético 30 mL

Misturar A e B, completar o volume até 300 mL com H_2SO_4 a 10%. Juntar à solução

6,0 g de iodo e agitar durante 30 minutos .

e) Reativo de Verde de Bromocresol (VBC)

A- Solução etanólica de VBC a 0,1%

B- Solução Tampão de Fosfato de Potássio pH 5,5

C- Água destilada

Misturar A,B e C na proporção 2 : 1 : 1 antes de aplicar

f) Solução de nitrito de sódio a 1% de preparo recente. Conservar sob refrigeração.

g) Reativo de p-nitroanilina diazotada (DCpn)

A. p-nitroanilina a 1% em HCl 1N

B. etanol

C. solução de NaNO₂ 5% de preparo recente (conservar sob refrigeração)

Misturar A e B (1:1); esta solução é estável por alguns meses, se conservada sob refrigeração. Antes de aplicar, juntar à mistura A/B a solução C, na proporção de (5:1). Observar a placa e anotar os resultados.

- Em seguida , tratar a cromatoplaça com solução de NaOH 50 % diluída, no momento de usar, com etanol a (1 : 10) .

III - EXTRAÇÃO

a) Extração de substâncias ácidas e neutras

1. Colocar 10 mL de urina em um funil de separação e medir o pH
2. Ajustar o pH entre 4,0 - 5,0 com solução de HCl 2%
3. Extrair com 20 mL de mistura éter-clorofórmio (1:3 v:v), agitando bem durante 1 min , decantar
4. Filtrar a camada orgânica sobre Na₂SO₄ anidro e recolher em bquer (50 mL)
5. Repetir os itens 3 e 4 . Reunir os extratos orgânicos
6. Evaporar o solvente até a secura na chapa aquecedora (60 – 70°C) Reservar o resíduo obtido (R₁)

b) Extração de substâncias alcalinas e neutras

1. Colocar outra alíquota de 10 mL da amostra de urina no funil de separação
2. Ajustar o pH entre 8,5 - 9,0 com solução de NaOH 5%
3. Extrair com 20 mL da mistura éter -clorofórmio (1:3 v:v), agitando bem durante 1 min , decantar
4. Filtrar a camada orgânica sobre Na₂SO₄ anidro e recolher em bquer (50 mL)
5. Ajustar o pH entre 10,5 - 11,0 por meio de solução de NaOH 1%
6. Repetir os itens 3 e 4. Reunir os extratos orgânicos e adicionar 1 gota de HCl 1% ao extrato orgânico
7. Evaporar o solvente até a secura, na chapa aquecedora (60 - 70°C). Reservar o resíduo obtido (R₂)

IV - IDENTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS POR CCD

a) Fármacos ácidos e neutros

1. Aplicar em duas placas cromatográficas (definida como “placa A e B”) cerca de 1 cm de capilar dos padrões de ácido salicílico, fenobarbital, tionembutal, fenitoína, cafeína, diazepam e haloperidol.
2. Solubilizar o resíduo R₁ com 0,5 mL de éter-clorofórmio (1:3 v:v), e transferir cerca de 1 cm de capilar para as duas diferentes placas cromatográficas (A e B).
3. Acondicionar ambas as placas no sistema solvente clorofórmio:acetona (4:1 v:v) e aguardar até o final da corrida.
4. Observar ambas as placas à luz ultravioleta (fotografar).
5. Revelar as placas com as seguintes sequências de reveladores:
Placa A: FeCl₃ → DI Placa B: HgSO₄ → DFC
6. Fotografar e anotar os HRf e as cores obtidas em cada placa.
7. Comparar os resultados obtidos para as amostras e padrões e identificar os fármacos presentes na amostra.

b) Fármacos alcalinos e neutros

1. Aplicar em duas placas cromatográficas (definida como “placa A e B”) cerca de 1 cm de capilar dos padrões de cafeína, diazepam, haloperidol, clorpromazina, fenilpropanolamina, nicotina, codeína, estricnina e cocaína.
2. Solubilizar o resíduo R2 com 0,5 mL de éter-clorofórmio (1:3 v:v), e transferir cerca de 1 cm de capilar para as duas diferentes placas cromatográficas (A e B).
3. Acondicionar ambas as placas no clorofórmio:metanol (9:1 v:v). e aguardar até o final da corrida.
4. Observar ambas as placas à luz ultravioleta (fotografar).
5. Revelar as placas com as seguintes sequências de reveladores:
Placa A: VBC → DCpn → NaOH Placa B: DI → NaNO₂ 1%
6. Fotografar e anotar os HRf e as cores obtidas em cada placa.
7. Comparar os resultados obtidos para as amostras e padrões e identificar os fármacos presentes na amostra.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - CLARKE'S - Isolation and identification of drugs. 2 nd ed., London, Pharmaceutical Press, 1986. 1223 p.
- 2 - MORAES, E.C.F. et al. - Manual de Toxicologia Analítica. São Paulo, Roca ed., 1991. 229 p.
3. MOREAU, R.L.M; SIQUEIRA, M.E.P.B. – Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008. 318 p.